

STRESZCZENIE

Populacje klonalnych mikroorganizmów naturalnie różnicują się fenotypowo pod wpływem czynników środowiskowych i genetycznych. W efekcie, poszczególne komórki w populacji klonalnej mogą wykazywać różnice we wzorcach ekspresji genów, stanie fizjologicznym i aktywności metabolicznej. Taka heterogeniczność fenotypowa (ang. *phenotypic heterogeneity*) może być korzystna ewolucyjnie, ponieważ heterogeniczne populacje są lepiej przystosowane do nieprzewidywalnych zmian środowiskowych dzięki subpopulacjom, które odmiennie reagują na presje selekcyjne.

W odpowiedzi na sygnały głodzenia, komórka może wejść w odwracalny stan zatrzymania podziałów, znanym jako stan spoczynkowy (ang. *quiescence*). Większość mikroorganizmów spędza znaczną część swojego życia w stanie spoczynkowym, który jest kluczowy dla przeżycia w długich okresach głodu i wznowienia podziałów po poprawie warunków. Jednak komórki nie reagują jednakowo na ten sam sygnał niedoboru składników odżywczych, co skutkuje powstaniem heterogeniczności. Przykładowo, w populacjach drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, sygnały głodu zwykle indukują przejście do stanu spoczynkowego u części komórek (komórki spoczynkowe, ang. *quiescent*, Q), podczas gdy inne komórki pozostają w stanie nie-spoczynkowym (ang. *non-quiescent* NQ). Te odmiennie fenotypowo subpopulacje można rozdzielić poprzez wirowanie w gradiencie gęstości: komórki Q znajdują się w dolnej frakcji, a komórki NQ w górnej frakcji. Frakcjonowanie w gradiencie gęstości jest jedną z najczęściej wykorzystywanych metod do badania zmienności fenotypowej w populacjach w kontekście stanu spoczynkowego.

W ROZDZIALE 1 rozprawy doktorskiej wykorzystano metodologię przeglądu systematycznego (ang. *systematic review*) w celu kompleksowej analizy metod stosowanych do badania stanu spoczynkowego *S. cerevisiae*. Artykuły badawcze pogrupowano na podstawie tego, czy uwzględniają heterogeniczność fazy stacjonarnej; chronologicznego wieku badanych populacji; metod użytych do indukowania stanu spoczynkowego oraz profilu metabolicznego szczepów. Na podstawie tych czynników zidentyfikowano najczęstsze i najrzadsze układy eksperymentalne. Z jednej strony, nasza praca podkreśla brak standaryzacji w raportowaniu szczegółów eksperymentalnych dotyczących komórek i populacji w stanie spoczynku, co może wprowadzać w błąd przy wyciąganiu ogólnych wniosków. Z drugiej strony, zróżnicowanie metodologiczne może być przydatne przy porównaniach na wyższym poziomie, które można przeprowadzić za pomocą metaanaliz. Publikację zakończono propozycją wytycznych dotyczących istotnych informacji o badanych populacjach spoczynkowych, które powinny zostać szczegółowo opisane w artykułach badawczych.

W ROZDZIALE 2 skupiono się na ewolucyjnym znaczeniu heterogeniczności fenotypowej w populacji poddanej głodzeniu. Analizowano wzrost po głodzeniu w monokulturach składających się tylko z jednego fenotypu komórkowego (tj. komórek spoczynkowych (Q) lub niespoczynkowych (NQ)), w porównaniu do mieszanych, heterogenicznych kultur (komórki Q i NQ) w ubogim (sterylna woda)

i złożonym (zużyte medium) środowisku głodzeniowym. Poprzez eksperymenty laboratoryjne i modelowanie matematyczne potwierdzono, że po długim głodzeniu monokultury Q mają najwyższą przeżywalność w obu środowiskach głodzeniowych oraz najkrótsze fazy lag po przełożeniu do świeżej pożywki wzrostowej. Jednak gdy okres głodzenia jest bardzo krótki, monokultury NQ mają przewagę nad monokulturami Q i mieszanymi dzięki krótszej fazie lag. Ponadto, przeżywalność monokultur NQ jest wyższa w złożonym środowisku głodzeniowym niż w środowisku ubogim. W pracy argumentowano, że komórki NQ wykorzystują potencjał recyklingu składników odżywczych w złożonym podłożu. Zebrane wyniki pokazują, że heterogeniczność fenotypowa, tj. obecność komórek Q i NQ może być adaptacyjną strategią *bet-hedging*, istotną zwłaszcza przy często zmieniających się czynnikach środowiskowych.

W ROZDZIALE 3 skupiono się na szlaku detekcji aminokwasów SPS i kompleksie SIR badając aspekt genetyczny proporcji komórek Q:NQ w kontekście tych genów. Przetestowano kilka mutacji w genach, które mogą być istotne w procesie przejścia do stanu spoczynkowego. Geny te w większości należą do szlaku SPS i kompleksu SIR. Przeanalizowano proporcje komórek Q:NQ i zawartość aminokwasów w populacjach posiadających różne mutacje w szlaku SPS i kompleksie SIR. Eksperymentalnie potwierdzono istotną rolę genu *SSY1*. Mutacje w *SSY1* zwiększające wrażliwość drożdży na wyczuwanie obecności aminokwasów, powodują zmniejszenie częstości przechodzenia w stan spoczynku i zwiększenie całkowitej zawartości aminokwasów w populacjach poddanych głodzeniu. W pracy zaproponowano, że ścieżka wyczuwania aminokwasów w środowisku za pośrednictwem szlaku SPS może być jednym z mechanizmów wpływających na przejście do stanu spoczynkowego.

W ROZDZIALE 4 skupiono się na metodach pomiaru efektywności wyjścia ze stanu spoczynkowego, tj. na fazie lag. Faza lag odnosi się do tymczasowego okresu, w którym populacja mikroorganizmów nie dzieli się po ekspozycji na podłoże bogate w składniki odżywcze. Długość fazy lag ma istotny wpływ na dostosowanie populacji (ang. *fitness*) i jest często mierzona w warunkach laboratoryjnych. Obliczenie długości fazy lag może być trudne i zależne od wybranej metody i parametrów. W ROZDZIALE 4 omówiono metody powszechnie stosowane w badaniach eksperymentalnych i teoretycznych, zwracając uwagę na niezgodności między metodami. Korzystając z danych eksperymentalnych i symulacji matematycznych, przeanalizowano skuteczność tych metod w zależności od parametrów takich jak częstotliwość pomiarów wielkości populacji i tempo wzrostu. Na podstawie wyników zaproponowano drzewo decyzyjne ułatwiające wybór metody najlepiej dopasowanej do danych eksperymentalnych. Dodatkowo, opracowano aplikację, która umożliwi obliczenie długości fazy lag z wykorzystaniem danych dostarczonych przez użytkownika.

Podsumowując, w rozprawie doktorskiej przeanalizowano różne aspekty heterogeniczności fenotypowej drożdży, ze szczególnym uwzględnieniem stanu spoczynkowego. Stan spoczynkowy jest kluczowym stanem komórkowym, ważnym w kontekście badań podstawowych i klinicznych. Uważam, że badania zaprezentowane w ramach tej rozprawy wnoszą cenne informacje o stanie spoczynkowym.